

脳 mitochondria の T.C.A. cycle に関する研究

第 2 編

真正癲癇および非癲癇患者大脳皮質 mitochondria の T.C.A. cycle に関する研究

岡山大学医学部第1（陣内）外科教室（指導：陣内教授）

医学士 樋口 慎之助

〔昭和34年1月6日受稿〕

第1章 緒言および文献

真正癲癇の成因に関してはかなり以前より種々の説が提唱されている。そのうち従来注目されてきたものとして、1) 酸塩基平衡障碍 (Bigwood¹⁾, 宮川²⁾), 2) 血液の酸素炭素ガス平衡障碍 (Nims³⁾, 宮川²⁾), 3) 水分代謝障碍, 脳の含水状態の異常, (McQuarrie⁴⁾, 宮川⁵⁾), 4) K, Mg, Ca, NH₄ などの塩分代謝障碍 (McQuarrie,⁶⁾ Gibbs, Lennox and Gibbs,⁷⁾ Hirschfelder,⁸⁾ Cohen et al⁹⁾), 5) 血糖異常 (Gibbs, Gibbs and Lennox),¹⁰⁾ 6) 血管攣縮説 (Forster etc¹¹⁾), 7) 脳および脳脊髄液内の座攣毒説 (Kroll¹²⁾), 8) 内分泌障碍説 (Fischer¹³⁾), 9) Acetylcholin 代謝障碍 (Pope¹⁴⁾), 10) Glutamic acid 障碍 (林¹⁵⁾, Weil-Malherbe¹⁶⁾) などがある。しかし、これらのうち人脳を用いて実験を行なっているものはきわめて少く、多くは患者の血液とか脳脊髄液の分析の成績から推察したものである。

最近になって真正癲癇に対し、大脳皮質剔除が行われるようになり、その際えられた脳組織片をもちいて、癲癇脳の特性を生化学的に解明せんとする試みが行われるにいたつた。今日までに明かにされた癲癇脳の特性のうちで重要なものについて述べると次のごとくである。

1) Cholinesterase (以下 ChE と略記する) 活性値の上昇

Pope, Moris, Jasper, Elliot and Penfield¹⁷⁾ によつて、癲癇脳の focus では ChE の活性の上昇があることが報告されており、教室の沖¹⁸⁾も同様の観察を行つている。また Tower は癲癇脳では ChE の活性値の上昇と同時に結合型 Acetylcholin 代謝に欠損があることを認めている。

2) 脳遊離 amino 窒素の減少

教室井上¹⁹⁾により癲癇脳では非癲癇脳にくらべ脳遊離 amino 窒素が減少していることが明らかにされている。また、Tower²⁰⁾は癲癇脳焦点では glutamine および glutamic acid 代謝に異常のあることを明らかにしているが、glutamine 酸および glutamine は脳遊離 amino 酸のうちもつとも大量に存するものであるという点はとくに注目にあたいする。

3) Na, K の代謝異常

Tower は脳組織内の Na と K の balance において癲癇脳では非癲癇脳に比し、K は low level であり、Na は high level であることを見出している。

私どもの教室においてはその後も引つづいて真正癲癇脳の特性の解明に関する研究がすすめられており、癲癇脳では glucose 代謝系の活性低下 (山本²¹⁾), 磷酸代謝の亢進 (東²²⁾), Warburg-Dickens 系の酸化能の低下 (小野田²³⁾) など多くの事実が明らかにされてきた。

私はこれらの研究の一環として本編ではさきに本論文第1編において潜在性脳局「A」家兎 (痙攣準備状態家兎) について行つたと同様な方法で、真正癲癇脳の T.C.A. cycle 各 member の酸化のされかたを非癲癇脳の場合と比較検討をおこなうこととした。

第2章 検査方法

第1節 検査材料

私どもの教室において外科手術によつてえた、患者の大脳皮質を検査にもちいた。すなわち癲癇例にあつては、Area 6, 非癲癇例にあつては前頭葉を用いた。これらの例を表記すると表1のごとくである。以上の患者のうち術前48時間以内に痙攣を起したものは検査例から除いた。

第2節 mitochondria の酸化力測定にもとづいた基質

T.C.A. cycle の中間代謝産物として, pyruvate, citrate, α -ketoglutarate, succinate, fumarate, malate, oxalacetate をもちいた。濃度はいずれも 0.1M である。

第3節 mitochondria の分離法

手術によつてえた大脳皮質をただちに 0°C の生理食塩液中に移し、灰白質のみを取り、0.25M の蔗糖液を媒質として homogenize し、第1編のごとく処理して mitochondria 分画を分離した。

第4節 呼吸測定装置および方法

第1編と同様 Warburg 検圧装置により測定し、反応系、方法もまったく第1編と同様にした。

第3章 検査成績

Pyruvate および T.C.A. cycle の中間代謝産物を基質として脳神経細胞 mitochondria の酸素消費量を真正癲癇および非癲癇患者の大脳皮質 mitochondria について検索した結果、つぎのことが明らかになった。

1) とくに基質を添加しない場合における酸素消費量は表1に示すごとくである。すなわち非癲癇例の酸素消費量 (mitochondria の乾燥重量 100mg に対する酸素消費量, μ l であらわす) は 6.5~13.4 μ l, 平均 9.2 μ l であり、癲癇例は 2.6~10.5 μ l, 平均 6.2 μ l で 32% の活性低下を示し、癲癇では非癲癇例の約 2/3 である。

2) Pyruvate を基質とした場合では、表2のごとく酸素消費量の増加は非癲癇例では 1.5~7.6 μ l, 平均 5.2 μ l であり、癲癇例では 1.1~5.1 μ l, 平均 2.9 μ l であり、基質を添加しない場合の酸素消費量に比較して、非癲癇例では 57%, 癲癇例では 47% の増加である。したがつて癲癇例は非癲癇例に比し 10% の活性低下を示し癲癇例は非癲癇例の約 2/3 である。

3) citrate を基質として添加すると、表3のごとく非癲癇例では 1.0~12.4 μ l, 平均 5.0 μ l, 癲癇例では 0~3.1 μ l, 平均 0.7 μ l であり、癲癇例では citrate はほとんど酸化を受けていないようである。

4) α -ketoglutarate を基質とした場合は表4に示すごとく、非癲癇例では 9.9~17.3 μ l, 平均 11.9 μ l であり、癲癇例では 0.6~6.9 μ l, 平均 4.7 μ l であり、53% の活性低下を認め、癲癇例は非癲癇例の約 1/2 である。

5) succinate を基質とした場合は、表5に示すごとく、非癲癇例 22.3~52.2 μ l, 平均 28.1 μ l, 癲癇

例 25.0~39.5 μ l, 平均 30.8 μ l であり、succinate を基質とした場合は他の基質の場合と異り、逆に癲癇例は、非癲癇例より酸化の亢進を認め、その差は 192% である。そしていずれの場合も他の基質の場合の数倍の酸化を認める。

6) fumarate を基質とした場合は、表6に示すごとく、非癲癇例では 1.1~8.4 μ l, 平均 3.5 μ l, 癲癇例では 0.3~2.9 μ l, 平均 1.1 μ l で 20% の活性低下を認める。

7) malate を基質とした場合は、表7に示すごとく、非癲癇例では 1.0~11.1 μ l, 平均 5.9 μ l であり、癲癇例では 1.2~2.9 μ l, 平均 1.9 μ l で 33% の活性低下を認めた。

8) oxalacetate を基質とした場合は、表8に示すごとく、非癲癇例では 8.9~21.2 μ l, 平均 11.4 μ l, 癲癇例では 2.4~10.2 μ l, 平均 5.4 μ l で 37% の活性低下を認めた。

9) 以上総括して表示すれば図1に示すごとく、非癲癇例では酸素消費量の増加は succinate > α -ketoglutarate > oxalacetate > pyruvate > malate > citrate > fumarate の順であり、一方癲癇例では succinate > oxalacetate > α -ketoglutarate > pyruvate > malate > fumarate > citrate の順であり、succinate 基質として添加した場合を除き、他のいずれを基質とした場合でも癲癇例は非癲癇例に比し酸素の消費が抑制されている。

第4章 総括ならびに考按

癲癇および非癲癇患者大脳皮質 mitochondria について pyruvate および T.C.A. cycle の各 member の酸化の程度を比較し、酸素消費の増加の大なるものより並べると、非癲癇例では succinate > α -ketoglutarate $\approx$ oxalacetate > malate $\approx$ pyruvate $\approx$ citrate > fumarate の順となり、真正癲癇例では succinate > oxalacetate $\approx$ α -ketoglutarate > pyruvate $\approx$ malate > fumarate $\approx$ citrate の順となることを認めた。すなわち両者間の間にとくに強調すべき順序の相違はみられない。

この順序を第1編において行つた実験的癲癇症ともいうべき潜在性脳局「ア」家兎についての実験と比較してみると、家兎の実験では正常家兎は succinate > α -ketoglutarate > oxalacetate > pyruvate > fumarate の順であり citrate, malate によつては酸素消費の増加を認めず、脳局「ア」家兎では succinate > pyruvate > α -ketoglutarate $\approx$ oxalacetate の順で、fumarate, citrate, malate によつて

は酸素消費の増加を認めなかつたわけであり、非癲癇例と正常家兎例の順序は succinate, α -ketoglutarate, oxalacetate と絶対量の大なるところではきわめてよく一致している。一方癲癇例と脳局「ア」家兎とを比較すると succinate が最大である点は共通であるが、癲癇例では α -ketoglutarate $\rightleftharpoons$ oxalacetate $>$ pyruvate の順であるのに対し、脳局「ア」家兎では pyruvate $>$ α -ketoglutarate $\rightleftharpoons$ oxalacetate の順であり、pyruvate の順位の点で真正癲癇と脳局「ア」家兎とは異っている。

つぎにこの事実を基質とした諸物質について非癲癇例と真正癲癇例とを比較してみると、まず基質をとくに添加していない場合は真正癲癇例は明らかに非癲癇例に比して酸素消費量が少い。次に pyruvate および T.C.A. cycle の各 member を基質として添加した場合の酸素消費量の増加を検した成績では、succinate を除く他の場合にはすべて癲癇例は非癲癇例に比して抑制されていることを知った。ところが succinate 添加例では、第 1 編における家兎の場合と同じく癲癇、非癲癇例ともに他の場合の数倍の酸素消費の増加を示し、さらに特異なことは基質のない場合の酸素の消費を考慮に入れなければ両者の活性はほとんど違わないけれども、この基礎呼吸を差引いたものをもつて当該物質を基質とする呼吸と考えると、非癲癇例では 28.1 μ l、真正癲癇例では 30.8 μ l で逆に癲癇例の方がやや大きな活性を有するという結果がでてきていることである。これは後述することく、他の T.C.A. cycle member には認められない現象であり、実験的癲癇症ともいべき脳局「ア」家兎においても認められなかつたものである。Bessman ら²⁴⁾ および Robert ら²⁵⁾ により succinate はその代謝過程において γ -aminobutyric acid の分解過程となんらかの関連があるのではないかと推察されているが、教室の森ら²⁶⁾ は真正癲癇ではこの γ -aminobutyric acid の代謝過程に異常があると考えているので、succinate の真正癲癇での呼吸促進は γ -aminobutyric acid の代謝異常となんらかの関連があるかもしれないが、その解明は今後の問題にまたねばならないであろう。

一方 succinate 以外の他の上述の member ではいずれも一様に、真正癲癇例においては非癲癇例に比

し活性の低下を認める。これを脳局「ア」家兎の場合と比較してみても、脳局「ア」家兎例は正常家兎例に比し、その比率はともあれ、それぞれ活性の低下が認められ、succinate を基質とするもの以外の点では癲癇の場合は潜在性脳局「ア」家兎の場合にきわめて近似していると考えられる。

第 5 章 結 論

非癲癇および真正癲癇患者の脳皮質 mitochondria について pyruvate および T.C.A. cycle の各 member を基質とする酸素消費を Warburg 検圧装置をもちいて測定してつぎのことを明らかにした。

1) とくに基質を添加しない場合の mitochondria の酸素消費量は癲癇例においては非癲癇例の約 70% で、低下している。

2) pyruvate を基質とする呼吸増加は真正癲癇では非癲癇例の約 70% である。

3) citrate を基質とすると、真正癲癇例では呼吸の増加は認められず、citrate は酸化されないが、非癲癇例では酸化される。

4) α -ketoglutarate を基質とした場合は、真正癲癇例の呼吸増加は非癲癇例の約 70% である。

5) succinate を基質とした場合は、真正癲癇例および非癲癇例共によく酸化され、両者とも他の member を基質とした場合の数倍の酸化を認め、さらに特異なことは succinate の場合のみ真正癲癇例の方が非癲癇例よりも、やや呼吸増加の程度が高いことである。

6) fumarate を基質とした場合は、真正癲癇の呼吸上昇は、非癲癇例の約 70% である。

7) malate を基質とした場合は、真正癲癇例の呼吸上昇は、非癲癇例の約 70% である。

8) oxalacetate を基質とした場合は真正癲癇例の呼吸増加は、非癲癇例の約 70% である。

9) 一般に真正癲癇では非癲癇例にくらべ、呼吸増加の割合が低下しているが、例外として succinate のみがやや亢進していることは特異的である。

稿を終るにあたり、御懇篤なる御指導および御校閲を賜った恩師陣内伝之助教授に深謝する。

表1 mitochondria による正常呼吸

非 癲 癇 例						真 癲 癇					
No.	氏 名	年 令	性	診 断	酸消 素費	氏 名	年 令	性	診 断	酸消 素費	
1	Y.S.	54	♂	グリオーム	13.4	K.D.	12	♂	真正癲癇	4.2	
2	Y.K.	7	♂	松果腺腫	6.5	Y.I.	8	♀	真正癲癇	8.3	
3	I.I.	57	♂	硬脳膜腫	9.1	S.F.	23	♂	真正癲癇	2.6	
4	H.H.	53	♀	グリオーム	9.0	H.I.	27	♂	真正癲癇	7.1	
5	K.N.	37	♂	グリオーム	9.4	S.S.	36	♂	真正癲癇	7.3	
6	T.I.	52	♂	グリオーム	9.6	T.S.	27	♂	真正癲癇	10.5	
7	T.M.	36	♂	硬脳膜腫	7.0	T.N.	20	♂	真正癲癇	3.7	
8	K.W.	3	♀	硬脳膜腫	9.3	S.O.	25	♀	真正癲癇	6.0	
平均					9.2					6.2	

切除部位

前頭葉

Area 6

表2 pyruvate 添加による呼吸変化

非 癲 癇					癲 癇				
No.	基 質		呼吸 増加	平 均 上昇率	No.	基 質		呼吸 増加	平 均 上昇率
	(-)	(+)				(-)	(+)		
1	13.4	20.2	6.8		1	4.2	9.3	5.1	
2	6.5	10.4	3.9		2	8.3	11.7	3.4	
3	9.1	14.0	4.9		3	2.6	4.3	1.7	
4	9.0	10.5	1.5		4	7.1	8.2	1.1	
5	9.4	15.2	5.8		5	7.3	9.6	2.3	
6	9.6	14.0	4.4		6	10.5	14.0	3.5	
7	7.0	14.0	7.0		7	3.7	6.6	2.9	
8	9.3	16.9	7.6		8	6.0	9.0	3.0	
平均	9.2	14.4	5.2	57%	平均	6.2	9.1	2.9	47%

表4 α -ketoglutarate 添加による呼吸変化

非 癲 癇					癲 癇				
No.	基 質		呼吸 増加	平 均 上昇率	No.	基 質		呼吸 増加	平 均 上昇率
	(-)	(+)				(-)	(+)		
1	13.4	24.3	10.9		1	4.2	9.2	5.0	
2	6.5	18.4	11.9		2	8.3	12.7	4.4	
3	9.1	20.2	11.1		3	2.6	7.9	5.3	
4	9.0	20.1	11.1		4	7.1	7.7	0.6	
5	9.4	19.3	9.9		5	7.3	11.6	4.3	
6	9.6	20.5	10.9		6	10.5	17.4	6.9	
7	7.0	24.3	17.3		7	3.7	9.6	5.9	
8	9.3	21.3	12.0		8	6.0	10.8	4.8	
平均	9.2	21.1	11.9	129%	平均	6.2	10.9	4.7	76%

表3 citrate 添加による呼吸変化

非 癲 癇					癲 癇				
No.	基 質		呼吸 増加	平 均 上昇率	No.	基 質		呼吸 増加	平 均 上昇率
	(-)	(+)				(-)	(+)		
1	13.4	18.7	5.3		1	4.2	4.2	0	
2	6.5	18.9	12.4		2	8.3	8.4	0.1	
3	9.1	13.6	4.5		3	2.6	5.7	3.1	
4	9.0	10.3	1.3		4	7.1	8.1	1.0	
5	9.4	13.6	4.2		5	7.3	7.7	0.4	
6	9.6	15.4	5.8		6	10.5	11.5	1.0	
7	7.0	8.0	1.0		7	3.7	3.7	0	
8	9.3	15.2	5.9		8	6.0	6.2	0.2	
平均	9.2	14.2	5.0	54%	平均	6.2	6.9	0.7	11%

表5 succinate 添加による呼吸変化

非 癲 癇					癲 癇				
No.	基 質		呼吸 増加	平 均 上昇率	No.	基 質		呼吸 増加	平 均 上昇率
	(-)	(+)				(-)	(+)		
1	13.4	36.7	23.3		1	4.2	43.7	39.5	
2	6.5	28.9	22.4		2	8.3	39.7	31.4	
3	9.1	32.5	23.4		3	2.6	30.2	27.6	
4	9.0	31.3	22.3		4	7.1	32.1	25.0	
5	9.4	33.8	24.4		5	7.3	36.3	29.0	
6	9.6	32.7	23.1		6	10.5	46.3	35.8	
7	7.0	41.2	34.2		7	3.7	30.6	26.9	
8	9.3	61.5	52.2		8	6.0	37.1	31.1	
平均	9.2	37.3	28.1	305%	平均	6.2	37.0	30.8	497%

表6 fumarate 添加による呼吸変化

非 癲 癇					癲 癇				
No.	基 質		呼吸 増加	平 均 上 昇 率	No.	基 質		呼吸 増加	平 均 上 昇 率
	(-)	(+)				(-)	(+)		
1	13.4	14.5	1.1		1	4.2	7.1	2.9	
2	6.5	14.9	8.4		2	8.3	9.9	1.6	
3	9.1	11.8	2.7		3	2.6	3.2	0.6	
4	9.0	10.4	1.4		4	7.1	7.4	0.3	
5	9.4	11.8	2.4		5	7.3	7.7	0.4	
6	9.6	10.7	1.1		6	10.5	11.0	0.5	
7	7.0	10.1	3.1		7	3.7	4.9	1.2	
8	9.3	17.7	8.4		8	6.0	7.2	1.2	
平均	9.2	1.7	3.5	38%	平均	6.2	7.3	1.1	18%

表7 malate 添加による呼吸変化

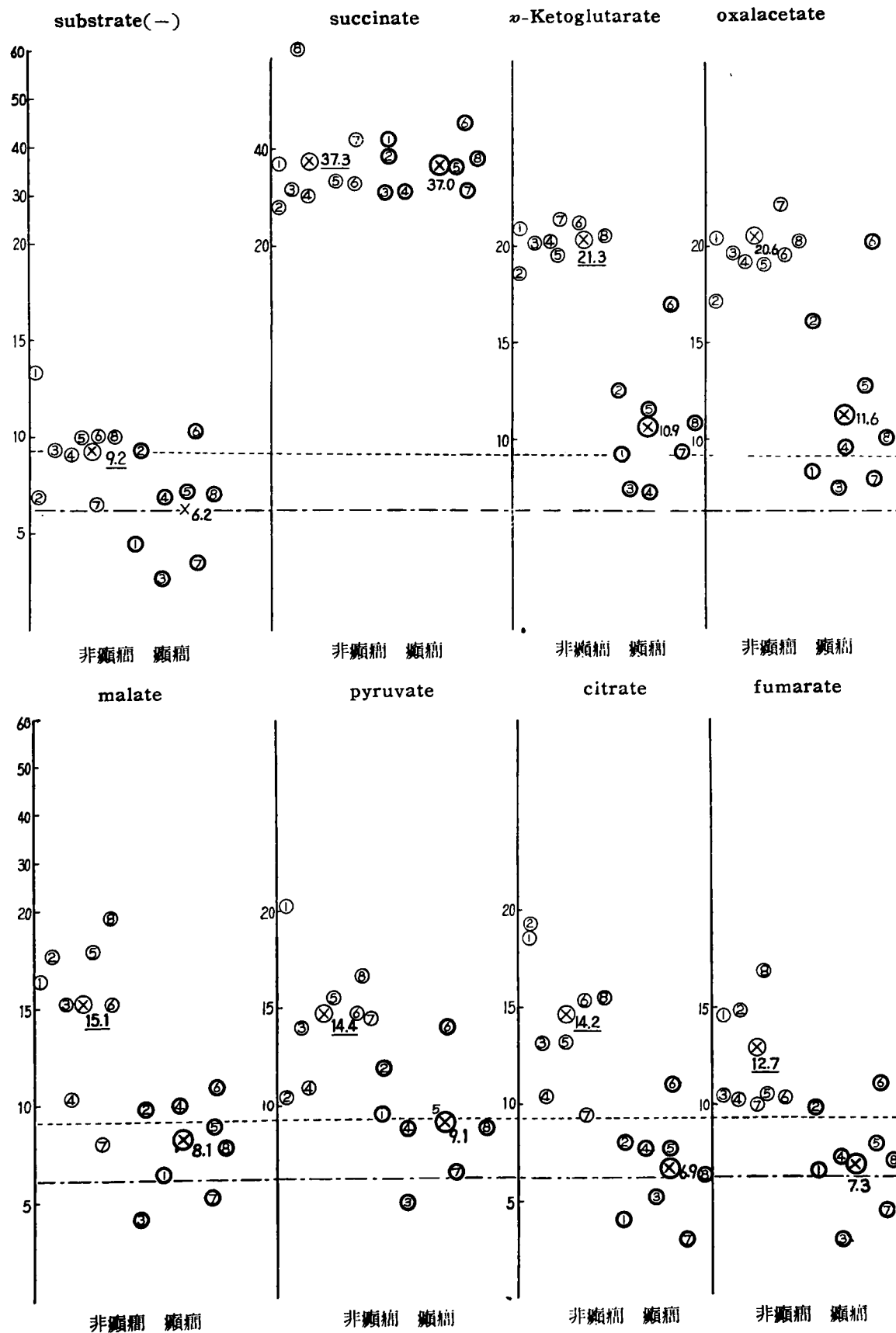
非 癲 癇					癲 癇				
No.	基 質		呼吸 増加	平 均 上 昇 率	No.	基 質		呼吸 増加	平 均 上 昇 率
	(-)	(+)				(-)	(+)		
1	13.4	16.4	3.0		1	4.2	6.6	2.4	
2	6.5	17.6	11.1		2	8.3	9.6	1.3	
3	9.1	15.6	6.5		3	2.6	4.2	1.6	
4	9.0	10.7	1.7		4	7.1	10.0	2.9	
5	9.4	17.7	8.3		5	7.3	9.0	1.7	
6	9.6	15.1	5.5		6	10.5	11.7	1.2	
7	7.0	8.0	1.0		7	3.7	5.4	1.7	
8	9.3	19.5	10.2		8	6.0	7.9	1.9	
平均	9.2	15.1	5.9	64%	平均	6.2	8.1	1.9	31%

表8 oxalacetate 添加による呼吸変化

非 癲 癇					癲 癇				
No.	基 質		呼吸 増加	平 均 上 昇 率	No.	基 質		呼吸 増加	平 均 上 昇 率
	(-)	(+)				(-)	(+)		
1	13.4	22.3	8.9		1	4.2	8.3	4.1	
2	6.5	17.3	10.8		2	8.3	16.3	8.0	
3	9.1	19.3	10.2		3	2.6	7.1	4.5	
3	9.0	18.5	9.5		4	7.1	9.5	2.4	
5	9.4	18.4	9.0		5	7.3	12.7	5.4	
6	9.6	19.1	9.5		6	10.5	20.7	10.2	
7	7.0	28.2	21.2		7	3.7	7.8	4.1	
8	9.3	21.9	12.6		8	6.0	10.0	4.0	
平均	9.2	20.6	11.4	124%	平均	6.2	11.6	5.4	87%

図 1

○ 非癲癇 (×) 平均值 非癲癇平均值
 ○ 真正癲癇 平均值 - - - - 癲癇平均值



文 献

- 1) Bigwood. : Zbl. Neur. **38**, 490, 1924.
- 2) 宮川 : 熊本医学会誌 **14**, 1999, 1938.
- 3) Nims et al. : Arch of Neur. **43**, 262, 1940.
- 4) McQuarrie. : Am. J. Dis. child., **72**, 472, 1946.
- 5) 宮川 : 精神神経誌 **44**, 325, 1940.
- 6) McQuarrie. . Am. J. Dis. child., **72**, 472, 1946.
- 7) Gibbs, Lennox and Gibbs. : Arch of Neur.' **43**, 223, 1940.
- 8) Hirschfelder and Hamy. : Arch. of Neur., **40**, 66, 1938.
- 9) Cohen et al. : Arch of Neur., **50**, 149, 1943.
- 10) Gibbs, Gibbs and Lennox. : Arch of Neur., **39**, 298, 1938.
- 11) Forster, 木村 : 医学春秋第1集73より引用.
- 12) F. W. Kroll. : Z. Neur., **39**, 298, 1938.
- 13) Fischer u. Thurzo. : Zbl. Neur., **43**, 707, 1926.
- 14) A. Pope, A. A. Moris, H. Jasper., K. A. C. Elliot and W. Penfield. : Research Pubs. Assoc. Research Nervous Mental Disease., **26**, 218, 1947.
- 15) 林 : 生理学会, 昭26総会
- 16) Weil-Malherbe. Physiol. Rev., **30**, 549, 1950.
- 17) Pope, Moris, Jasper etc. : Research in. Nervous and Mental Disease. : **26**, 218, 1947
- 18) 沖 : 岡山医学会雑誌, **64**, 1625~1637, 昭27.
- 19) 井上, 森, 吉川 : 第8回中四国生化学総会昭33.
- 20) Tower D. B. : Neurology, **5**, 113, 130, 1955.
- 21) 山本 : 生化学投稿予定.
- 22) 東 : 岡山医学会雑誌投稿予定.
- 23) 小野田 : 岡山医学会雑誌投稿予定.
- 24) Bessman, S. P., Rossen, J. and Layne, E. C. : J. Biol. chem., 201, 385, 1953.
- 25) Roberts, E. and Bregoff, H. M. : J. Biol. chem., 201, 393, 1953.
- 26) 森 : 未発表

Studies on the TCA cycle in Brain mitochondria

1st Department of Surgery, Okayama University Medical School.

(Director: Prof. D. Jinnai)

Part II, On the non-epileptic and epileptic brain mitochondria

By

Shinnosuke HIGUCHI

The respiration of human brain mitochondria was measured by the Warburg's manometer and the members of the TCA cycle were used as the substrate.

The O_2 -uptake of the non-epileptic brain mitochondria is about one and half times of the epileptic brain mitochondria.

On the oxidation of the substrate:

Malate, fumarate, pyruvate, oxalacetate and α -ketoglutarate accelerate the O_2 -uptake in both cases, and the O_2 -uptake of non-epileptic cases are always 2 or 3 times of the epileptic cases.

Citrate accelerate the O_2 -uptake in the non-epileptic case, but not in the epileptic case.

Succinate accelerate the O_2 -uptake in both cases and its about several times of the other substrate.

Especially the increase of the O_2 -uptake of the epileptic brain mitochondria by succinate is higher than of the non-epileptic brain mitochondria.
